天净沙系列

CAT#:220314

低温运输，-20℃保存

天净沙

DNA 探针标记试剂盒，自备标记核苷酸（随机引物法）

DNA Probe Labeling Kit (Random Priming)

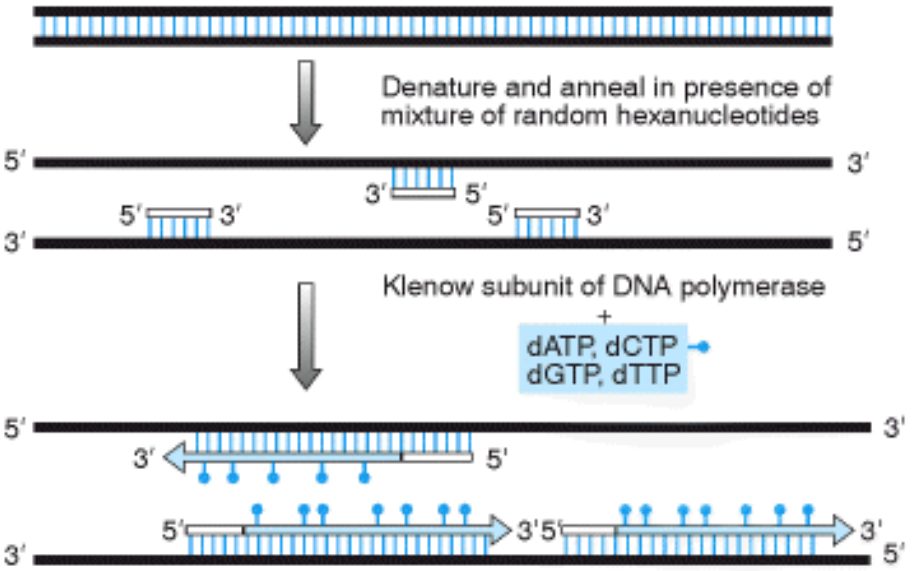
使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是基于 Feinberg 和 Vogelstein 发明的随机引物标记法而开发出来的即用型 DNA 探针标记试剂盒，标记过程由双链 DNA 热变性、随机引物与单链 DNA 结合、在 Klenow DNA 聚合酶催化下，引物的延伸合成 DNA 探针并掺入标记的核苷酸三步组成，可用下面的示意图表示：



本产品对 Feinberg 和 Vogelstein 经典方法进行了改良，具有下列特点：

1. 提供的标记反应液整合了除酶和模板外的所有成分，简化了反应加样步骤，提高了标记反应的可重复性。
2. 使用无外切活性的 Klenow exo- DNA 聚合酶，已标记 DNA 探针不会被酶降解，探针产量更高。
3. 快速，最快 1 小时即可完成标记反应。
4. 得到的 DNA 探针比活性高（如果是同位素，可以达到 1E9 cpm/μg DNA）。
5. 所需模版 DNA 量少，模板可以是线状或环状的、也可以是单链或双链的，但长度必须在 100 bp 以上。
6. 得到的探针长度一般在 200-400 nt 之间（如果模板长度在 1 kb 以上），可以用于 Southern 杂交、Northern 杂交、原位杂交、菌落和斑点印迹杂交等。
7. 本产品足够 5 次标记实验。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用十孔盒包装

成份	编号	规格	包装
10×随机引物标记反应液（自备标记核苷酸型）	220314a	10 μL	0.5 mL 绿盖管
Klenow exo-聚合酶	220314b	5 μL	0.5 mL 红盖管

dATP，2 mM	220314c	10 μL	0.5 mL 白盖管
dTTP，2 mM	220314d	10 μL	0.5 mL 紫盖管
dGTP，2 mM	220314e	10 μL	0.5 mL 蓝盖管
dCTP，2 mM	220314f	10 μL	0.5 mL 黄盖管
标记专用随机引物干粉	220314g	2 μg	0.5 mL 橙盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	220314sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备物品

0.5 M EDTA（pH 8.0），需要自备标记的核苷酸，超纯水。

使用方法

注意：随机引物标记效率跟起始模板量和保温时间相关，杂交时需要探针 DNA 必须达到一定的浓度，其中探针/模板比越高，没有标记的模板 DNA 对杂交的竞争性抑制越低。用户在实验前可以根据下表选择合适的起始模板量和保温时间：

起始模版 DNA 用量（单位：ng）	1 小时后探针合成量（探针模板比）	20 小时后探针合成量（探针模板比）
10	80 ng（8）	900 ng（90）
30	150 ng（5）	1350 ng（45）
100	350 ng（3.5）	1650 ng（16.5）
300	750 ng（2.5）	2200 ng（7.3）
1000	1300 ng（1.3）	2600 ng（2.6）
3000	1600 ng（0.53）	2600 ng（0.87）

1. 使用前将装有标记专用随机引物干粉的离心管短暂离心，在往管中加入 10 μL 超纯水，得 0.2 μg/μL 随机引物溶液，放冰上待用，没用完的此溶液需在-20℃保存。
2. 在一干净的硅化的塑料离心管中加入下列成分：

成分	用量
模板 DNA	50-150 ng
随机引物	2 μL
10×随机引物标记反应液	2 μL
超纯水	补水到 15 μL

注意：非同位素标记基团（如生物素和地高辛）疏水性强，易与塑料离心管表面非特异性结合，所以要硅化塑料离心管。模板 DNA 并非越多越好，否则没有标记

	的模板 DNA 在杂交时会竞争性地抑制标记 DNA 跟靶分子的杂交，反而降低杂交信号强度。 3. 沸水浴 10 分钟，或在 PCR 仪上 100℃加热 10 分钟彻底变性模板 DNA，结束后需要立即放冰上待用。不能缓慢降温，否则变性的模板 DNA 单链又会杂交形成双链。 4. 离心数秒使所有液体集中在管底，如果标记物为 dTTP 则加入除 dTTP 之外的三种核苷酸（dATP、dGTP、dCTP）各 1 μL（共 3 μL，浓度均为 2 mM），自备的 dTTP/标记 dUTP 混合物 1 μL，最后加入 1 μL Klenow exo 聚合酶。如果标记物为 dCTP 则加入除 dCTP 之外的三种核苷酸(dATP、dGTP、dTTP)各 1 μL，以此类推。 注:dTTP/标记 dUTP 混合物中 dTTP 和标记 dUTP 的总浓度必须达到 2 mM，dTTP 与生物素标记 dUTP 或地高辛标记的 dUTP 的比例在 65:35 为最佳。但如果使用自备的其他标记核苷酸，如 fluorescein、hydroxycoumarin、resorufin 和 aminoallyl 标记的 dUTP，则用户需要自己摸索其与 dTTP 之间的最佳比例，如果使用 32P 标记的 dUTP，则比活最好为 3000 Ci/mmol，浓度为好为 10 μCi/μL，并且不需要加入 dTTP。 5. 轻柔吹打混匀。如有液滴沾在管壁上，离心数秒使所有液体集中在管底。 6. 37℃保温 1-20 小时。反应结束后加热 100℃ 5 分钟使 DNA 聚合酶变性，同时使 DNA 探针变性成单链，然后立即冰上冷冻。不能缓慢降温，否则变性的模板 DNA 单链又会杂交形成双链。 7. 变性后的标记反应液可以放-20℃长期保存，也可以直接加入到杂交反应液中进行杂交。如果电泳检测，标记产物将是弥散状态。 注意：本方法标记核苷酸掺入率极高，因此可以不经纯化直接使用。如果需要纯化，不要用酚抽提法纯化非同位素标记的 DNA 探针，因为这些标记分子（如生物素或地高辛等）疏水性强，能使标记的 DNA 进入疏水的有机相而丢失。只能选择乙醇直接沉淀或 Sephadex G50 过柱回收（需另购柱式探针纯化试剂盒）。对比活高的同位素标记探针，由于同位素其极其不稳定，因此应该立即使用，不要长久放置。
关联产品	Bicine-NaOH 缓冲液，0.5 M，pH 8.5